

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：24520121153224

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

水溶性金属酞菁红区光学探针
在生物大分子及无机阴离子检测中的应用

Applications of Aqueous Metal Phthalocyanine
Spectroscopic Probes in the Analysis of Biomacromolecules
and Inorganic Anions

杨惠卿

指导教师姓名：李东辉 教授

专业名称：药 理 学

论文提交日期：2015年4月

论文答辩时间：2015年5月

学位授予日期：2015年 月

答辩委员会主席：

评 阅 人：

2015年4月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(李东辉教授)课题(组)的研究成果,获得(李东辉教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(生物医学分子光谱学)实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

金属酞菁是一类化学性质稳定（耐热、耐酸、耐碱），较易合成的化合物。自Braun和Tehemiac获得第一个酞菁化合物以来，酞菁化合物由于其特殊的物理化学和光学性质而在化学和化工领域得到了广泛研究和应用。上世纪80年代开始，酞菁化合物在生物医学领域的应用也逐步得到开发应用。由于金属酞菁的吸收峰和荧光发射峰都在长波区段，可以避免绝大多数天然物质背景光的干扰，在生物化学分析中具有广泛的应用前景。本论文围绕水溶性金属酞菁作为分子探针在生物大分子和无机阴离子检测中的应用而展开。

第一章就长波长光学探针的应用进行了阐述。首先，简要介绍了光学探针的原理、长波长光学探针的特点以及长波长光学探针应用于化学及生物化学领域的优势；其次，对长波长光学探针在小分子化合物、生物大分子的检测以及生物成像中的应用进行了总结，重点阐述了近几年长波长荧光探针在生物活体成像中的应用进展。

第二章建立了快速、灵敏测定RNA酶的荧光增强分析法。中性介质中，具有红区发射特性的强荧光化合物阳离子铝酞菁（Tetra(trimethylammonio) aluminum phthalocyanine, TTMAAlPc）在低浓度的RNA存在下，发生诱导聚集，导致酞菁荧光几乎完全猝灭。缔合物中的RNA在RNA酶的水解作用下发生降解，其对TTMAAlPc的诱导聚集行为被破坏而使TTMAAlPc被释放，体系荧光显著恢复。据此现象，以TTMAAlPc-RNA缔合物作为RNA酶的新型荧光底物，建立了荧光增强测定RNA酶的新方法。本法用于复杂实际样品（正常成年人尿液）的测定，并与常规的分光光度法进行比较，结果符合良好。

第三章基于组蛋白对核酸的非特异性结合作用和对四磺基铝酞菁的高效荧光猝灭作用建立了荧光增强测定DNA的新方法。荧光光谱行为的考察显示，在pH 8.5的Tris-HCl缓冲液介质中，带有正电荷的组蛋白（Histones）可几乎完全猝灭AlS₄Pc的荧光，二者形成无荧光离子缔合物。在DNA的存在下，体系荧光显著恢复，最大恢复倍数可达400倍。据此发现建立了DNA测定新方法。AlS₄Pc-Histones体系对于DNA的响应是非特异性的，适用于不同种类、来源和长度的核

糖核酸，具有重要的实际应用价值，这是本章的重要发现。

第四章建立了高选择性测定水相 MoO_4^{2-} 离子的分光光度新方法，并进而开发裸眼检测 MoO_4^{2-} 离子的新模式。

水溶性的四磺基酞菁镍(Nickel 4,4',4'',4'''-Tetrasulfophthalocyanine, NiS_4Pc)可与 Pb^{2+} 离子形成难溶性的复合物，而多种酸根离子可溶解该复合物，在低浓度苯磺酸的存在下，绝大多数阴离子对沉淀的溶解作用被完全或显著抑制，只有 MoO_4^{2-} 离子仍能溶解 $\text{NiS}_4\text{Pc-Pb}$ (II) 沉淀复合物而释放出 NiS_4Pc ，溶液相显示 NiS_4Pc 的特征颜色和吸收，基于此现象，我们将 $\text{NiS}_4\text{Pc-Pb}$ (II) 作为 MoO_4^{2-} 的特异性识别探针，并建立了 MoO_4^{2-} 定量分析新方法。本法特异性强，稳定性极佳，操作简便快速，并可实现目视化观测，这对于现场或野外分析尤有价值。

第五章建立了特异性测定水相 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 离子的分光光度新方法，同时开发裸眼检测 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 离子的新模式。

水溶性的 NiS_4Pc 与 Pb^{2+} 离子形成难溶性的复合物，在低浓度柠檬酸的存在下，绝大多数阴离子对 $\text{NiS}_4\text{Pc-Pb}$ (II) 沉淀复合物的溶解作用几乎被完全抑制，只有 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 离子仍能溶解 $\text{NiS}_4\text{Pc-Pb}$ (II) 沉淀复合物而释放出 NiS_4Pc ，溶液相显示 NiS_4Pc 的特征颜色和吸收，根据这一现象，我们开发了 $\text{NiS}_4\text{Pc-Pb}$ (II) 作为 $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 离子的特异性识别探针。本法实现了目视化检测，特异性强，稳定性极佳，操作简便快速，具有很强的实用性。

关键词：酞菁；生物大分子；无机阴离子；检测

Abstract

Phthalocyanine was first discovered by Braun and Tehemiac, the special optical properties of phthalocyanine compounds had being widely studied and applied in chemistry and biochemistry ever since. In general, metal phthalocyanines are stable compounds with easy way of synthesis. They have been attracting more and more attention of analysts because of their great potential to be candidates of molecular probes in last decades. Fluorescent phthalocyanine compounds can effectively avoid the interference of fluorescence and scattering light from background, as their absorption peak and fluorescence emission peak appear at long-wavelength region. This paper focuses on the application of aqueous metal phthalocyanines in the analysis of biological molecules and inorganic anions.

In chapter 1, the application of long-wavelength optical probe was reviewed. Firstly, the paper introduces the basic principles of the optical probe and the characteristics of long-wavelength optical probe. Then the practicality of long-wavelength optical probe in chemistry and biochemistry fields was illustrated. The detection of small molecules, biological macromolecules and the application of biological imaging with long-wavelength optical probe were mentioned respectively. This chapter makes a notably mention of the biological imaging in vivo with long-wavelength optical probe in recent years.

In chapter 2, we had found that a low concentration of RNA could induce cationic aluminum phthalocyanine (TTMAAlPc) which emitted strong red fluorescence to aggregate in neutral media, resulting in an almost complete quenching of fluorescence from the cationic aluminum phthalocyanine. The RNA is degraded through hydrolysis by RNase, which destroys the induced aggregation of TTMAAlPc on RNA and releases free TTMAAlPc, leading to a significant fluorescence recovery of the reaction system. Based on this new finding, a method to detect RNase by enhanced fluorescence was established using the

TTMAAlPc-RNA association complex as a new fluorogenic substrate of RNase. This method had been applied in the analysis of ribonuclease in the urine specimens from healthy adults, and the results were consistent with those determined by conventional spectrophotometric methods. The developed method is easy to operate and highly sensitive, and has a wide linear range, thus solving issues with conventional methods.

In chapter 3, the main idea of this part of work is to develop a non-specific method for the determination of DNA with high sensitivity. The fluorescence of AlS₄Pc was almost quenched by low concentration of histones in weakly alkaline medium due to induced aggregation, but recovered significantly in the presence of DNA. Based on this phenomenon, a novel method for quantitative determination of DNA was proposed. The established method shows non-specificity to DNA in different size, structure (single strand or double strand), and origins. This work has resolved the common issue present in the detection of nucleic acids. It is convenient for application in the practical determination.

In chapter 4, we develop a novel spectrophotometric method for highly selective determination of MoO₄²⁻ ions in the aqueous phase. A new mode for the naked eye detection of MoO₄²⁻ is also established. Water-soluble tetrasulphonated nickel phthalocyanine (NiS₄Pc) forms an insoluble complex with Pb²⁺. A variety of acid radical ions can dissolve the NiS₄Pc-Pb(II) complex. At low benzenesulphonic acid concentration, the dissolution of the precipitate by most anions is completely or substantially inhibited, and only MoO₄²⁻ can dissolve the NiS₄Pc-Pb(II) precipitate to release NiS₄Pc, where the solution phase displays the characteristic colour and absorption of NiS₄Pc. This finding indicates that NiS₄Pc-Pb(II) can be used as a specific identification probe for MoO₄²⁻ anions. This method, which has high specificity, excellent stability and simple, rapid operation is highly practical. The novel method can realise visual observation, which is especially valuable for on-site or field analysis.

In the final chapter, we developed a novel spectrophotometric method for specific determination of P₃O₁₀⁵⁻ ions in the aqueous phase and a naked eye detection

of $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$. NiS_4Pc forms an insoluble complex with Pb^{2+} while the dissolution of the insoluble complex by most anions is almost completely inhibited at low citric acid concentrations, and only $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ can dissolve the $\text{NiS}_4\text{Pc-Pb(II)}$ precipitate to release NiS_4Pc , where the solution phase displays the characteristic colour and absorption of NiS_4Pc . We applied this new finding to develop a specific identification probe for $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ions. In summary, this method which has a strong practicability is easy to operate and highly stable, and can realise visual observation.

Keywords: phthalocyanine; determination; biological macromolecules; inorganic anions

目 录

摘 要	I
Abstract	III
第一章 前 言	1
1.1 光学探针技术的应用研究进展	1
1.1.1 光学探针技术概述	1
1.1.2 长波长光学探针的应用	2
1.1.2.1 小分子化合物检测中的应用	2
1.1.2.2 生物大分子分析中的应用	3
1.1.2.3 光学成像中的应用	4
1.1.2.4 其他	11
1.2 课题设想	12
参考文献	13
第二章 基于阳离子铝酞菁-RNA 红区荧光底物分析 RNA 酶的新方 法	18
2.1 引言	18
2.2 实验部分	19
2.2.1 仪器	19
2.2.2 试剂	19
2.2.3 实验方法	19
2.3 结果与讨论	20
2.3.1 TTMAAlPc 的分子结构与光谱特性	20
2.3.2 反应机理探讨	21
2.3.2.1 反应体系的荧光行为	21
2.3.2.2 反应体系的荧光各向异性研究	24
2.3.3 实验条件的优化	25
2.3.3.1 TTMAAlPc/RNA 用量比例的优化	25

2.3.3.2 缓冲体系和 pH 的优化	26
2.3.3.3 反应时间的选择	27
2.3.3.4 反应温度的选择	27
2.3.4 TTMAAlPc 对 RNase 活性影响的考察	28
2.3.5 标准曲线的绘制	29
2.3.6 共存物质的影响	29
2.3.7 实际样品的测定	30
2.4 结 论	31
参考文献	32
第三章 四磺基铝酞菁-组蛋白离子对荧光探针的构造与 DNA 非特 异性定量分析方法的建立	34
3.1 引言	34
3.2 实验部分	35
3.2.1 仪器	35
3.2.2 试剂	35
3.2.3 实验方法	36
3.3 结果与讨论	36
3.3.1 AlS ₄ Pc 的结构与性质	36
3.3.2 组蛋白浓度的优化	38
3.3.3 缓冲体系和 pH 的优化	38
3.3.4 反应时间的选择	40
3.3.5 反应温度的选择	40
3.3.6 标准曲线的绘制	40
3.3.6.1 核糖核酸（钠盐）的工作曲线	40
3.3.6.2 核糖核酸（非钠盐）的工作曲线	42
3.3.7 共存物质的影响	44
3.4 结论	44
参考文献	45
第四章 四磺基镍酞菁-铅（II）分子探针对钼酸根的高选择性响应及	

其定量分析新方法	48
4.1 引言	48
4.2 实验部分	49
4.2.1 仪器	49
4.2.2 试剂	49
4.2.3 实验方法	49
4.3 结果和讨论	50
4.3.1 NiS ₄ Pc 的分子结构与吸收光谱	50
4.3.2 Pb ²⁺ 对 NiS ₄ Pc 的沉淀作用	51
4.3.3 NiS ₄ Pc 对 MoO ₄ ²⁻ 离子的高选择性线性响应与裸眼观测	52
4.3.4 反应机理	54
4.4 实验条件的优化	55
4.4.1 Pb(NO ₃) ₂ / NiS ₄ Pc 用量比例的优化	55
4.4.2 酸性抑制剂的选择	56
4.4.3 反应时间的选择	56
4.4.4 反应温度的选择	57
4.4.5 四磺基镍酞菁用量的影响	57
4.4.6 方法的选择性	58
4.4.7 标准曲线	58
4.5 裸眼检测实验	58
4.6 结论	59
参考文献	63
第五章 四磺基镍酞菁-铅(II)分子探针对多聚磷酸根的高选择性 响应及其定量分析新方法	66
5.1 引言	66
5.2 实验部分	67
5.2.1 仪器	67
5.2.2 试剂	67
5.2.3 实验方法	67

5.3 结果与讨论	68
5.3.1 NiS ₄ Pc 的分子结构与吸收光谱	68
5.3.2 Pb ²⁺ 对 NiS ₄ Pc 的沉淀作用	69
5.3.3 NiS ₄ Pc 对 P ₃ O ₁₀ ⁵⁻ 离子的高选择性线性响应与裸眼识别	70
5.3.4 反应机理	72
5.4 实验条件的优化	73
5.4.1 Pb(NO ₃) ₂ / NiS ₄ Pc 用量比例的优化	73
5.4.2 酸性抑制剂的选择	74
5.4.3 柠檬酸用量的选择	74
5.4.4 反应时间的选择	75
5.4.5 反应温度的选择	76
5.4.6 四磺基镍酞菁用量的影响	76
5.4.7 方法的选择性	77
5.4.8 标准曲线	77
5.5 裸眼检测实验	77
5.6 结论	78
参考文献	79
致 谢	82
附录：硕士期间发表论文	83

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Research progress of long wavelength optical probe	1
1.1.1 Introduction of long wavelength optical probe	1
1.1.2 The application of long wavelength optical probe	2
1.1.2.1 The application in the analysis of small molecules	2
1.1.2.2 The application in the analysis of biological macromolecule	3
1.1.2.3 The application in optical imaging	4
1.1.2.4 other	11
1.2 Thesis Design	12
References	13
Chapter 2 Novel method for the analysis of ribonuclease based on fluorescence recovery of a cationic aluminum phthalocyanine -RNA association complex as a Red-Emitting fluorogenic substrate	18
2.1 Introduction	18
2.2 Experimental	19
2.1.2.1 Apparatus	19
2.1.2.2 Reagents	19
2.1.2.3 Experimental methods	19
2.3 Results and discussion	20
2.3.1 Molecular structure and spectral characteristic of TTMAAlPc	20
2.3.2 Discussion of the reaction mechanism	21
2.3.2.1 Forescence behavior of the reaction system	21

2.3.2.2 Fluorescence anisotropy of the reaction system	24
2.3.3 Optimization of the experimental conditions	25
2.3.3.1 Optimization of the TTMAAlPc/RNA ratio	25
2.3.3.2 Optimization of the buffer system and pH	26
2.3.3.3 Selection of the reaction time	27
2.3.3.4 Selection of the reaction temperature	27
2.3.4 Impact of TTMAAlPc on RNase activity	28
2.3.5 Plot of the calibration curve	29
2.3.6 Impact of the coexisting substances	29
2.3.7 Detection of real samples	30
2.4 Conclusions	31
References	32
Chapter 3 Non-specific determination of DNA based on shifting the association equilibrium between tetrasulphonated aluminium phthalocyanine and Histones	34
3.1 Introduction	34
3.2 Experimental	35
3.2.1 Apparatus	35
3.2.2 Reagents	35
3.2.3 Experimental methods	36
3.3 Results and discussion	36
3.3.1 Molecular structure and spectral characteristic of AlS ₄ Pc	36
3.3.2 Optimization of the concentration of histones	38
3.3.3 Optimization of the buffer system and pH	38
3.3.4 Selection of reaction time	40
3.3.5 Selection of temperature	40
3.3.6 Plot of the calibration curve	40
3.3.6.1 Calibration curve of nucleic acid (sodium salt)	40

3.3.6.2 Calibration curve of nucleic acid (no sodium salt)	42
3.3.7 Impact of the coexisting substances	44
3.4 Conclusions	44
References	45
Chapter 4 Highly selective and sensitive determination of molybdate by a NiS₄Pc-Pb(II) molecular probe	48
4.1 Introduction	48
4.2 Experimental	49
4.2.1 Apparatus	49
4.2.2 Reagents	49
4.2.3 Experimental methods	49
4.3 Results and discussion	50
4.3.1 Molecular structure and absorption spectra of NiS ₄ Pc	50
4.3.2 NiS ₄ Pc precipitation by Pb ²⁺	51
4.3.3 Highly selective linear response of NiS ₄ Pc to MoO ₄ ²⁻ ions and naked eye observation	52
4.3.4 Reaction mechanism	54
4.4 Optimisation of experimental conditions	55
4.4.1 Optimisation of Pb(NO ₃) ₂ /NiS ₄ Pc dose proportionality	55
4.4.2 Selection of acidic inhibitor	56
4.4.3 Selection of reaction time	56
4.4.4 Selection of reaction temperature	57
4.4.5 Dose effect of NiS ₄ Pc	57
4.4.6 Selectivity of analysis method	58
4.4.7 Calibration curve	58
4.5 Naked eye detection	58
4.5 Conclusions	59
References	63

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.